猪源益生芽孢杆菌的分离鉴定与生物学特性分析[1]

蒋佳璇[1]　王淑京[1]　任志鸿[1]　杜华茂[2*]

（1.西南大学生物技术学院，重庆 400715；2.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，传染病预防控制国家重点实验室，北京 102206）

摘　要：本研究旨在从健康猪肠道正常菌群中筛选出性能良好的芽孢杆菌，以用于提高饲料利用率、减少猪消化道感染及减少感染后抗生素的使用。本研究精选重庆偏远山区从未添食配合饲料且生产性能优良的经产母猪，从其新鲜粪便中分离耐酸、耐胆盐的芽孢杆菌，进一步筛选能同时产淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶的菌株，最后进行生化鉴定和基于16S rDNA序列的分子鉴定。结果表明，试验共筛选出7株能同时分泌淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶的芽孢杆菌，它们在pH 3.0条件下处理2 h存活率为30%～90%，在0.5%胆盐中处理2 h存活率为40%～100%。经生化鉴定与分子鉴定为1株嗜热脂肪芽孢杆菌，1株地衣芽孢杆菌，5株枯草芽孢杆菌。由结果可知，本研究筛选的7株芽孢杆菌能耐受低pH和高胆盐环境，且具备同时分泌淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶3种胞外酶的能力。

关键词：益生菌；芽孢杆菌；生化鉴定；16S rDNA；产酶能力

中图分类号：S811.6　　　　　文献标识码：　　　　　文章编号：

抗生素滥用引发的耐药菌及超级耐药菌株严重威胁着人类的健康，开发微生物添加剂是替代饲料抗生素的重要方向。我国于2013年批准了34种可直接添加的微生物，美国食品药物管理局（FDA）批准42种，其中芽孢杆菌占6种[1]。芽孢杆菌类益生菌除生物占位及生物夺氧作用抑制病原性细菌外，还通过其在肠道内产生多种水解酶类及生长刺激因子等提高饲料利用率，从而促进畜禽生长。叶光斌等[2]用平板法测得猪源芽孢杆菌3种酶的透明圈直径/菌落直径（D/d）值在2~4。唐丽江等[3]、谢凤行等[4]从土壤分离芽孢杆菌并评价产淀粉酶活性，用诱变育种提高其产酶能力，使D/d值翻1倍。现有报道筛选的芽孢杆菌多是具有某1种或2种酶的产生能力，同时具备分泌多种胞外酶能力的芽孢杆菌尚未作研究。能同时分泌淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶3种胞外酶的芽孢杆菌能更大限度地发挥其营养效果。本研究拟从偏远山

收稿日期：2016-04-09

基金项目：传染病预防控制国家重点实验室留学归国人员启动经费(2011SKLID301)

作者简介：蒋佳璇（1992—），女，重庆合川人，硕士研究生，从事微生物学方向研究。E-mail：jjx411uan@126.com

*通信作者：杜华茂，副教授，硕士生导师，E-mail： duhmao@swu.edu.cn

区农户未饲用混合饲料且生产性能优良的经产母猪粪便中筛选出对低pH和高胆盐有较好的耐受性，且同时产淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶的芽孢杆菌菌株，为饲用益生菌专一性制剂产品的开发和应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜粪便，采自重庆北碚散户饲养的太湖母猪。

参考菌株 S1-2，来自富硒-枯草芽孢杆菌饲料添加剂（活菌数 5×10^{10} CFU/g，神微生物菌种科技有限公司，GB/125884—2010）。

LB 培养基、淀粉培养基、酪素培养基、羧甲基纤维素钠培养基、牛胆盐、盐酸。API50CHB/E 和 API50CH（北京威泰科生物技术有限公司）、DNA 提取试剂盒（北京擎科生物新业生物技术有限公司）。

1.2 试验方法

1.2.1 芽孢杆菌的初筛

取少量粪便标本解冻，震荡混匀后分装。取 1 份粪便样品于 80 ℃水浴 15 min，梯度稀释后涂布于 LB 琼脂平板，每板 50 μL，于 37 ℃培养 18~24 h 后挑取不同单菌落纯化 2 代。

1.2.2 耐酸及耐胆盐试验

挑取生长旺盛的单菌落到 1 mL LB 培养基中，于 37 ℃振荡（120 r/min）培养 6 h 后，按 5%的接种量转入 pH 3.5 的磷酸盐缓冲液（PBS）中，对照组为 pH 7.0 的 PBS，2 h 后将菌液进行梯度稀释涂板，每个梯度 2 个重复。于 37 ℃培养 18 h 后进行平板活菌计数并按下式计算存活率。

存活率（%）=（试验组菌落数/对照组菌落数）×100。

挑取耐酸试验存活率高于 40%的菌株进行耐胆盐试验。将培养了 6 h 后的菌液按 5%的接种量转入含 0.5%牛胆盐的 LB 培养基中，对照组不添加胆盐。培养 24 h 后将菌液梯度稀释后涂板，每个梯度 2 个重复。培养 18 h 后取出平板进行活菌计数并计算存活率，计算方法同上。

1.2.3 产酶试验

1.2.3.1 产淀粉酶试验

按文献[5]进行，主要方法如下：用无菌牙签蘸取单菌落点种于淀粉平板上，每株菌 3 个重复点，1 个纯水对照点。于 37 ℃培养 24 h 后加入 1 mL 的碘液使均匀覆盖平板，4 ℃静置 10 min 后分别测量透明圈直径（D）及菌落直径（d），计算透明圈直径/菌落直径（D/d）值，取平均值。

1.2.3.2　产纤维素酶试验

按文献[6]进行，主要方法如下：将待测菌株点种于羧甲基纤维素钠平板上，每株菌 3 个重复点，1 个纯水对照点。于 37 ℃培养 24 h 后，先用 0.2%刚果红染色 30 min，然后依次用蒸馏水和 1 mol/ L NaCl 彻底洗去染液，每次洗脱时间为 5 min，再用 5%醋酸固定颜色 5 min。分别测量 D 和 d，计算 D/d 值，取平均值。

1.2.3.3　产蛋白酶试验

按文献[6]进行，主要方法如下：将待测菌株点种于酪素平板上，每株菌 3 重复点，1 个纯水对照点。于 37 ℃培养 48 h 后取出。分别测量 D 和 d，计算 D/d 值，取平均值。

1.2.4　分离菌株的耐酸与耐胆盐能力

为了筛选到更适合生产应用的菌株，将能产 3 种酶的菌株再作进一步的耐酸性分析，测定其在 pH 2.0、2.5、3.0 条件下处理 2 h 后的存活率。同时复检其对 0.5%胆盐的耐受性。

1.2.5　生化鉴定

选择 3 种产酶试验中 D/d 值大于 1 且 D、d 值大于 2 mm 的菌株进行微生物学鉴定。

将各株分离菌在 LB 平板培养 18 h，挑取几个一致的菌落在 API50CHB/E 培养安瓿中制成菌悬液，浊度相当于 2 MCF。贴壁加 1 滴菌悬液到 API50CH 试剂条的每个反应孔中，再加 1 滴矿物油进行封闭，放置于 37 ℃培养箱，观察并记录 24、48 h 小时的生化反应结果，根据 API 细菌生化反应鉴定系统判定结果具体操作方法按说明书进行。

1.2.6　16S rDNA 序列分析

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒，按照革兰氏阳性菌基因组 DNA 的提取方法提取各菌株的基因组 DNA。按文献[7]进行 PCR 扩增 16S rDNA，引物为 27F：5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’和 1492R：5’-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3’。PCR 产物送擎科公司（北京）进行双向测序。

将所测序在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对，获得相似性大于 99%的菌株及序列。应

用软件 MEGA 6.0 以邻近法构建系统发育树。

1.2.7 统计分析

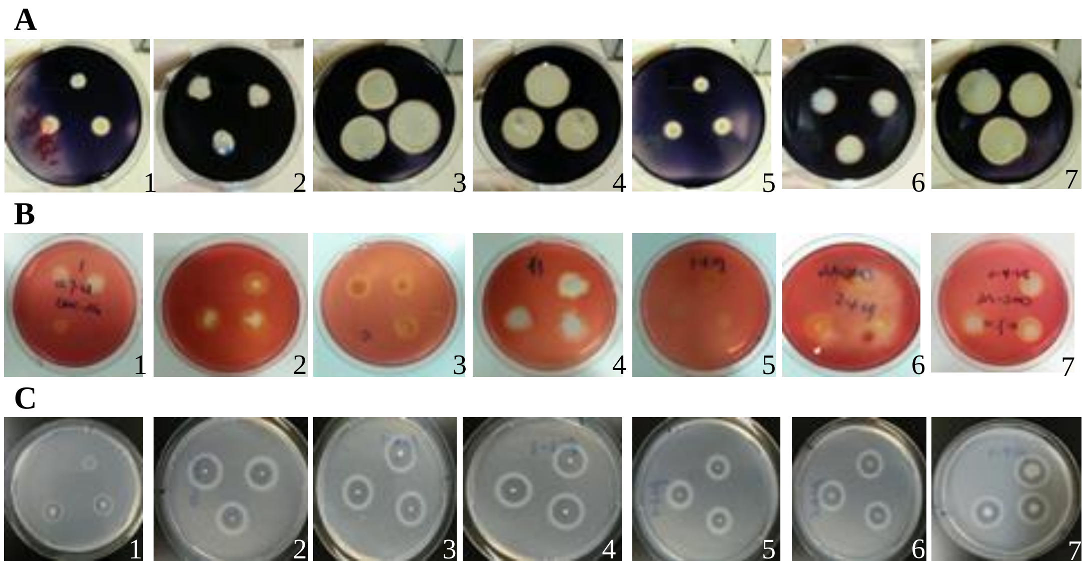
运用软件 SPSS 19.0 对 D/d 值数据进行统计分析，选择 LSD 法进行多重比较，试验数据以平均值±标准差表示，P<0.05，P<0.01 分别表示差异显著和极显著。

2 结果与分析

将 9 个样品进行 80 ℃水浴 15 min 后涂板，培养 24 h 共挑出 52 株菌。将这些菌株和参考菌株 S1-2 在 pH 3.5 条件下处理 2 h，在 0.5%胆盐条件下处理 24 h 后，筛选出耐酸、耐胆盐存活率均大于 40%的细菌共 13 株，以供产酶能力的检测。

2.1 产酶能力

采用透明圈法定性检测菌株产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶的能力，若有透明圈产生，则说明该菌株能产生该酶。D/d 值反映了产酶能力的大小，若 D/d 值大于 1，则表示此菌具备向胞外分泌该酶的能力，D/d 值越大，产酶能力越强。



A：淀粉酶 amylase；B：纤维素酶 cellulase；C：蛋白酶 protease；

1：P1.1-4；2：P1.1-10；3：P1.2-1；4：P1.2-3；5：P1.3-1；6：P1.3-5；7：P1.4-2

图 1 产酶试验结果图

Fig. 1 Image of enzyme production experiment

商品化参考菌株 S1-2 及 7 株分离菌（P1.1-4、P1.1-10、P1.2-1、P1.2-3、P1.3-1、P1.3-5、

P1.4-2）能同时产淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶（图 1）。各菌的透明圈大小不一，初步说明菌株之间产酶能力存在差异。其余 6 株菌因为不同时表达 3 种酶，未在文中列出。但值得一提的是菌株 S1.1-10，虽然不产生淀粉酶，但其产蛋白酶的 D/d 值是菌株 S1-2 的 3 倍。

测量各菌株的 D 和 d，并计算两者的比值，由 3 次试验数据计算平均值与标准差并进行多重比较（表 1）。由表 1 可知，所分离的 7 株芽孢杆菌产纤维素酶水平与 S1-2 没有显著差异（$P>0.05$）。就淀粉酶而言，P1.1-10、P1.2-1、P1.2-3、P1.3-1、P1.3-5 与 S1-2 没有显著差异（$P>0.05$），P1.4-2 的产酶量显著低于 S1-2（$P<0.05$），而 P1.1-4 的产酶量极显著高于 S1-2（$P<0.01$)。分离的菌株有较强产蛋白酶的能力，其中 P1.1-10、P1.3-1 产酶量高于 S1-2，差异极显著（$P<0.01$)，P1.2-1、P1.2-3 产酶量显著高于 S1-2（$P<0.05$)。其余 3 株菌与 S1-2 没有显著差异（$P>0.05$）。由此看来，没有一株菌能同时高产 3 种酶，所以今后的益生菌制剂需要采取将几种菌配合使用。

表 1　透明圈直径/菌落直径值

Table 1　The ratio of transparent circle diameter against colony diameter (D/d)

菌株 Strains	淀粉酶 Amylase	纤维素酶 Cellulase	蛋白酶 Protease
S1-2	$1.51±0.42^{Aa}$	1.53±0.06	$3.69±0.85^{Aa}$
P1.1-4	$2.03±0.30^{Bb}$	1.47±0.58	$2.90±0.91^{Aa}$
P1.1-10	$1.56±0.16^{Aa}$	1.79±0.06	$7.90±0.55^{Bb}$
P1.2-1	$1.24±0.08^{Aa}$	1.81±0.02	$6.00±2.21^{Ab}$
P1.2-3	$1.12±0.03^{Aa}$	1.21±0.21	$6.10±1.28^{Ab}$
P1.3-1	$1.64±0.07^{Aa}$	1.60±0.12	$6.56±0.76^{Bb}$
P1.3-5	$1.43±0.01^{Aa}$	1.31±0.09	$3.41±0.24^{Aa}$
P1.4-2	$1.08±0.01^{Ab}$	1.29±0.08	$2.28±0.40^{Aa}$

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），不同大写字母表示差异极显著（$P<0.01$），相同或无字母表示差异不显著（$P>0.05$）。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P<0.01$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

2.2　对酸性条件及胆盐的耐受性

动物胃中的 pH 在 2.0～4.0 之间，食物在胃中的排空时间为 2～4 h。我们进一步考察 7 株能同时分泌 3 种酶的细菌在 pH 2.0、2.5、3.0 条件下处理 2 h 后的存活率。随着 pH 的降低，7 株菌存活率有不同程度地下降（图 2），在 pH 2.0 极端条件下处理 2 h 后，仍然有存活细菌（图中未给出）。这 7 株菌对酸的耐受能力差异较大，P1.1-4 和 P1.4-2 耐受能力较强，在 pH 3.0 时有较高存活率且明显大于参考菌株 S1-2。

经 0.5%胆盐培养基处理 2 h 后，S1-2、P1.2-3、P1.4-2 的存活率分别为 33.6%、40.0%、84.4%。其他 5 株菌 100%存活，表现出不同程度地生长，其中 P1.1-4 和 P1.2-1 的菌数翻了 1 倍（数据未显示）。

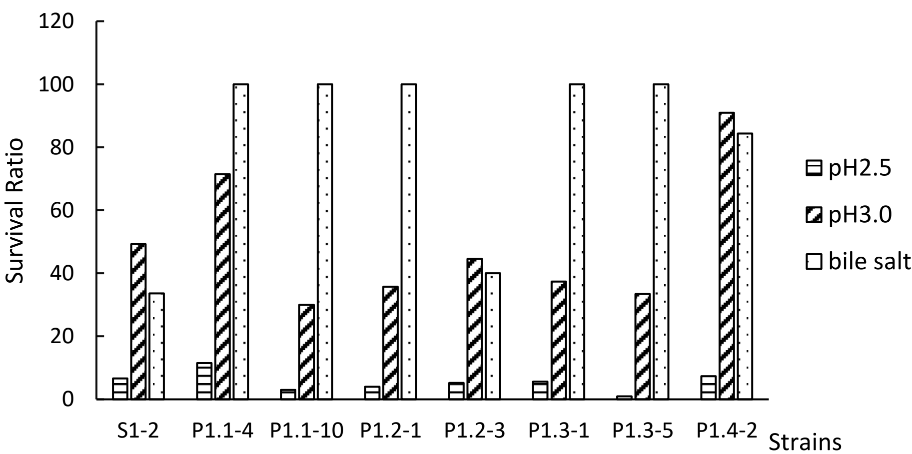


图 2　7 株菌在不同 pH 条件下耐受 2 h 和高胆盐条件下耐受 24 h 后的存活率

Fig 2　The survival ratio of 7 isolates in different low pH for 2 h and high bile salt for 24 h

2.3　生化鉴定及 16S rDNA 分子鉴定

根据 API 鉴定系统，将 P1.2-1 鉴定为 *B. stearothermophilus*，P1.3-5 鉴定为 *B.licheniformis*。

虽然对谷氨酸和 *D*-龙胆二糖等的发酵反应并不一致，系统将 P1.1-4、P1.1-10、P1.2-3、P1.3-1、P1.4-2 及 S1-2 都鉴定为 *B. subtilis*（表 3）。API 鉴定系统还规定，生化反应鉴定百分率（Id）高于 80%才有意义，若低于 80%则需重新鉴定；T 指数表示菌的典型性，T 指数越高则菌越典型。从 Id 值及 T 指数来看，将 S1-2 鉴定为 *B. subtilis* 属于"极好"的鉴定，满足 Id≥99.9%，T 指数≥0.75 的条件；对 P1.2-3 及 P1.4-2 的鉴定属于"很好"，满足 99.0%≤Id≤99.8%，T 指数≥0.75 的条件；对 P1.3-1 鉴定结果为基本可信，其他鉴定结果属于"好"，满足 90.9%≤Id≤98.9%，T 指数≥0.25 的条件。总之，对 8 株菌的鉴定结果是有意义的，是可信的。

表 3　API 细菌生化鉴定结果

Table 3　Results of API bacterial biochemistry characterization

菌株 Strains	有意义的分类单位 Meaningful classification unit	鉴定百分率 Identification/%	T 指数 T-index
S1-2	*Bacillus subtilis*	99.9	0.79
P1.1-4	*Bacillus subtilis*	98.1	0.77
P1.1-10	*Bacillus subtilis*	99.9	0.49
P1.2-1	*Bacillus stearothermophilus*	96.2	0.5
P1.2-3	*Bacillus subtilis*	99.6	0.85
P1.3-1	*Bacillus subtilis*	80.1	0.95
P1.3-5	*Bacillus licheniformis*	97.2	0.83
P1.4-2	*Bacillus subtilis*	99.6	0.82

通过对 7 株备选株的 16S rDNA 测序进行核苷酸序列比对，并构建系统进化树（未提供），结果显示 7 株菌的 16S rDNA 序列均与芽孢杆菌相似性极高，但亲缘关系较近的种与生化鉴定的种并不完全一致。如表 4 所示，与 S1-2、P1.1-10、P1.3-1 和 P1.4-2 最近的种是 *B. subtilis*，与 API 鉴定结果一致，其他 4 株菌则不同。

表 4　16S rDNA 序列比对结果

Table 4　Results of 16S ribosomal DNA identification

菌株 Strains	相似菌株 Similar strain	覆盖率 Query coverage	同源性 Identification

S1-2	*Bacillus subtilis* （KT719632.1）	100	99
P1.1-4	*Bacillus tequilensis* （KT982221.1）	99	99
P1.1-10	*Bacillus subtilis* （KM365462.1）	99	100
P1.2-1	*Bacillus subtilis* （GU902972.1）	99	100
P1.2-3	*Bacillus amyloliquefaciens* （KT961125.1）	99	99
P1.3-1	*Bacillus subtilis* （U902972.1）	99	99
P1.3-5	*Bacillus amyloliquefaciens* （KC953598.1）	99	99
P1.4-2	*Bacillus subtilis* （KF649246.1）	98	100

3 讨 论

3.1 样品来源

由于益生菌具有种属特异性，所以选用猪粪便作为芽孢杆菌的分离材料以备后续猪饲料添加剂之用。据 Lu 等[8]报道，运用 454 焦磷酸测序技术比较分析仔猪和育肥猪在饲喂天然饲养和合成饲料时肠道微生物菌群结构，结果表明天然饲养条件下肠道菌群种类更为丰富且致病菌的比例更低。Alexopoulos 等[9]报道，地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌益生菌添加剂不仅降低了母猪产后体重骤减的幅度，提高母猪产后进食率和产奶量，降低母猪泌乳障碍综合征的发生率，而且减少了仔腹泻的发生，使体重增加，并最终提高了仔猪的存活率。对于芽孢杆菌的抗菌活性，Ye 等[10]的研究结果表明肠道中的芽孢杆菌对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、志贺氏菌等都有不同程度的抑制作用，可作为主要研究菌种来开发。所以本次试验选择偏远山区农户未饲用混合饲料且生产性能优良的经产母猪，拟从其健康的肠道菌群中分离出适合作饲料添加剂的益生性芽孢杆菌。

3.2 耐酸耐胆盐能力分析

饲用益生菌中的乳酸杆菌、链球菌等胃肠道固有菌类营养要求较高，生长条件苛刻，不适用于工业规模化生产[11]。而芽孢杆菌营养要求低，培养条件简单，作为益生菌可提高饲料的消化性和营养价值，且对胃酸、胆汁、辐射等恶劣条件有很强的抵抗力，获得的芽孢休眠体稳定性能好，可在肠道中萌发成营养细胞参与肠道菌群与有害菌竞争营养和生存空间，并可刺激免疫系统改善宿主功能。本次研究筛选的 7 株能同时分泌淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶的菌株对 pH 3.0 的耐受性能达到 2 h 内 30%~90%的存活率，且大多数在 0.5%胆盐中 100%

存活，有 2 株菌还能继续生长繁殖。因此，这几株菌作为微生物添加剂是可以发挥生物占位和生物夺氧作用的。

3.3　产酶性能

所有菌株产淀粉酶与纤维素酶的能力普遍较低，D/d 值在 1~2 左右，P1.1-4 最大，也仅为 2.03。令人可喜的是，有 4 株分离菌株产蛋白酶的能力很强，D/d 值达到 6~7 之间，是叶光斌等[2]报道菌株的 2~3 倍。P1.1-10 分离株产蛋白酶最强，D/d 值达到 10，但它不表达淀粉酶。产酶透明圈的大小不能完全说明酶活性的高低，所以透明圈小的菌株不一定酶活性低。从这次试验结果来看，健康猪肠道的芽孢杆菌的理化特性存在很强的多样性，不同菌株产同一种酶的能力差异很大。因此，调节肠道功能的微生态制剂，在耐酸耐胆盐的前提下，要综合考虑其产酶水平，将不同菌株按适当的比例配合才能达到对粗蛋白质及碳水化合物的良好分解作用，尤其以提高粗蛋白质的消化利用率最重要。

3.4　生化鉴定和分子鉴定

对于优选的 7 株芽胞杆菌，我们采取 2 种方法进行鉴定。其一是用梅里埃生化试剂条进行 49 项生化反应，其二是基于 16S rDNA 部分序列的分子鉴定，但鉴定结果并不完全一致，仅 S1-2、P1.1-10、P1.3-1 和 P1.4-2 都鉴定为 *B. subtilis*。本文暂时采用 API 的生化鉴定结果，今后再做更全面的分子鉴定。生化鉴定结果与分子鉴定结果不相符的情况经常发生，原因在于 16S rDNA 分子的进化与用于酶鉴定的管家基因的进化并不完全同步，也可能是所比对的 16S rDNA 序列长度有限，不能很好地代表菌株的遗传信息[12]。从这次试验结果来看，健康猪肠道的芽孢杆菌存在很明显的生物多样性，但也存在菌群优势，本试验分离到 5 株枯草芽孢杆菌，1 株嗜热脂肪芽孢杆菌，1 株地衣芽孢杆菌。宁豫昌等[13]从猪粪便中分离 13 株芽孢杆菌，其中有 9 株为枯草芽孢杆菌。据此初步认为枯草芽孢杆菌为猪肠道的优势芽孢菌。

4　结　论

本研究通过高温、耐酸和耐胆盐试验分离对低 pH 和高胆盐都有良好耐受性的菌株，再通过选择性培养基透明圈试验从中筛选到 7 株能同时分泌淀粉酶、蛋白酶及纤维素酶 3 种胞外酶的优势菌株，经生化反应和 16S rDNA 分子鉴定其均为芽孢杆菌属。

致谢：西南大学谢和芳教授对本文试验数据的统计方法和统计结果分析提出了宝贵意见，在

此深表谢意。

参考文献

[1] 高林,白子金,冯波,等.微生物饲料添加剂研究与应用进展[J].微生物学杂志,2014,34(2):1–6.

[2] 叶光斌,王彩虹,熊俐,等.3 株芽孢杆菌产酶性质的初步研究[J].江苏农业科学,2013,41(7):240–242.

[3] 唐丽江,王振华,王迪.高产淀粉酶芽孢杆菌菌株的筛选[J].安徽农业科学,2009,37(12):5362–5363,5371.

[4] 谢凤行,赵玉洁,周可,等.产胞外淀粉酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及其紫外诱变育种[J].华北农业学报,2009,24(3):78–82.

[5] ZHAO W,ZHENG J,WANG Y G,et al.A marked enhancement in production of amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in flask fermentation using statistical methods[J].Journal of Central South University of Technology,2011,18(4):1054–1062.

[6] VIJAYARAGHAVAN P,ARUN A,AL-DHABI N A,et al.Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulase and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation[J].Biotechnology for Biofuels,2016,9:73.

[7] ASH C,FARROW J A E,WALLBANKS S,et al.Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences[J].Letters in Applied Microbiology,1991,13(4):202–206.

[8] LU X M,LU P Z,ZHANG H.Bacterial communities in manures of piglets and adult pigs bred with different feeds revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2014,98(6):2657–2665.

[9] ALEXOPOULOS C,GEORGOULAKIS I E,TZIVARA A,et al.Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores,on the health status and performance of sows and their litters[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2004,88(11/12):381–392.

[10] YE X L,LI X G,YUAN LJ,et al.Relationship between the antibacterial and immunological

activities of houttuyfonate homologues and their surface activities[J].Journal of Asian Natural Products Research,2006,8(4):327–334.

[11] HYRONIMUS B,MARREC C L,SASSI A H,et al.Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria[J].International Journal of Food Microbiology,2000,61(2/3):193–197.

[12] TOLBA O,EARLE J A P,MILLAR B C,et al.Speciation of *Bacillus* spp.in honey produced in Northern Ireland by employment of 16S rDNA PCR and automated DNA sequencing techniques[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2007,23(12):1805–1808.

[13] 宁豫昌,赵绪永,郑鸣.猪源芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].中国畜牧兽医,2012,39(9):65–68.

Isolation, Identification and Biological Characterization of *Bacillus* spp from Swine[1]

JIANG Jiaxuan[1] WANG Shujing REN Zhihong DU Huamao[2*]

（1. *College of Biotechnology, Southwest University*, *Chongqing* 400715, *China*; 2. *National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention Chinese Center for Disease Control and Prevention*, *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control*, *Beijing* 102206, *China*）

Abstract: The aim of this project was to isolate *Bacillus* spp with good performance from the normal intestinal flora of healthy swine, and to improve the feed utilization rate, reduce the infection of pig digestive tract and reduce the use of antibiotics. The feces specimen were collected from local back-yard cows which never feed with manufactured feeds, and the *Bacillus* spp with acid and bile salt tolerance was isolated from fresh feces. The isolates were then tested for the production potency of amylase, cellulose and protease on specific agar plates. The strains were identified by biochemical assays and 16s rDNA sequence alignment analysis. The results showed that 7 *Bacillus* strains were isolated which could secrete amylase, cellulose and proteinase. The survival ratios of *Bacillus* strains in pH 3.0 for 2 hours were 30% to 90%, and in 0.5% bile salt for 4 hours were 40% to 100%. The strains were identified as *Bacillus stearothermophiluc* (1 strain), *Bacillus licheniformis* (1 strain) and *Bacillus subtilis* (5 strains) by biochemical

*Corresponding author, professor, E-mail: duhmao@swu.edu.cn （责任编辑 武海龙）

identification and molecular identification, respectively. In conclusion, it selects 7 strains identified *Bacillus* spp, which have good tolerance in low pH and high bile salt conditions, and the strains can secrete amylase, cellulose and proteinase.

Key words: probiotics; *Bacillus* spp; biochemical identification; 16S rDNA; enzyme production capacity